

Afdeling Spectroscopie/Electrochemie/  
Radioaktiviteit/Hormonen 1986-02-12  
RAPPORT 86.29 Pr.nr. 505.0720

Onderwerp: Het gebruik van spectrum-  
subtraction bij het onder-  
zoek van anabolica in  
HPLC-fracties.

Verzendlijst: directeur, directie VKA, sektorhoofd, afdeling SERH (3x),  
bibliotheek (2x), projectleider, projektbeheer,  
circulatie.

Projekt: Ontwikkeling en toepasbaar maken van spectroscopische analysesmethoden.

Onderwerp: Het gebruik van spectrumsubtraction bij het onderzoek van anabolica in HPLC-fracties.

---

Doel:

Trachten aan de hand van de analyse van een tweetal injectiepreparaten van anabolica meer inzicht te verkrijgen in de manier waarop de correctie voor de achtergrond het best kan worden toegepast.

Samenvatting:

In dit verslag worden twee mogelijkheden voor correctie voor de achtergrond besproken:

- a. correctie voor de blanco HPLC uit een apart uitgevoerde blanco-run met dezelfde retentie als de analytfractie.
- b. correctie voor de blanco, gevormd uit een gemiddelde blanco, vlak voor en na de analytfractie.

Aan de hand van spectra wordt het een en ander geïllustreerd.

Conclusie:

Visueel is er voor de onderzochte monsters geen verschil waar te nemen tussen de spectra verkregen met de twee hierboven beschreven methoden. Methode b. is eenvoudiger uit te voeren, en verdient daarom de voorkeur.

---

Verantwoordelijk: dr W.G. de Ruig

Medewerkers : H. Hooijerink, J.M. Weseman

Samensteller : J.M. Weseman

Projectleider : J.M. Weseman

## Inhoudsopgave

1. Inleiding
2. Spectrumsubtraction, principe
3. HPLC
  - 3.1 Monsters/uitgangsmateriaal/opmerking
  - 3.2 Blanco
4. Infraroodonderzoek
  - 4.1 Diffuse-reflektie techniek (DRIFT)
  - 4.2 Resultaat
5. Spectrumsubtraction
  - 5.1 Formule spectrumsubtraction
  - 5.2 Correctie volgens procedure 5a
  - 5.3 Correctie volgens procedure 5b
  - 5.4 Resultaat
  - 5.5 Matrix c.q. achtergrond
6. Conclusie

## 1. Inleiding

Infraroodspectra verkregen van componenten uit HPLC-fracties worden soms zeer sterk beïnvloed door een matrix. De mate van beïnvloeding is afhankelijk van de verhouding monster/matrix; wanneer naar verhouding weinig van de component aanwezig is zal de matrix zo'n grote invloed hebben op het infraroodspectrum, dat nauwelijks iets van de te onderzoeken component in dat spectrum te herkennen is.

Aan de hand van de analyse van een tweetal injectiepreparaten van anabolica is bestudeerd wat de beste manier van correctie voor de achtergrond is.

Dit onderzoek is mede uitgevoerd als voorbereidend werk voor de LC-IR techniek waarbij we ook rekening hebben te houden met een achtergrond. Naast de matrix uit het monster heeft ook het eluens invloed op het spectrum.

In dit verslag wordt vooral de nadruk gelegd op de twee mogelijkheden voor correctie van de achtergrond nl.:

- a. Correctie voor de blanco HPLC uit een apart uitgevoerde blanco-run met dezelfde retentie als de analytfractie.
- b. Correctie voor de blanco, gevormd uit een gemiddelde blanco, vlak voor en vlak na de analytfractie, in dezelfde run.

## 2. Spectrumsubtraction, principe

Spectrumsubtraction houdt in dat spectra gecorrigeerd worden voor een achtergrond. Deze procedure wordt al routinematig toegepast bij spectra die waterdamp bevatten. Ieder verkregen "single-beam" spectrum bevat waterdamp tenzij het monstercompartiment zo lang met stikstofgas wordt gespoeld dat daarin geen waterdamp, maar ook geen kooldioxide meer aanwezig zijn.

Om een monstercompartiment waterdampvrij te maken is zeker een spoeltijd nodig van 20 minuten, vooral bij microbepalingen waar de storende invloed van waterdamp het grootst is.

Waterdamp is in het spectrum aanwezig in de gebieden  $4000-3500\text{ cm}^{-1}$  en  $1900-1300\text{ cm}^{-1}$  (zie spectrum A). Voor waterdamp is gemakkelijk te corrigeren wanneer als werkgebied het gebied tussen  $1800$  en  $1400\text{ cm}^{-1}$  wordt genomen.

Waterdamp is wel een heel eenvoudig voorbeeld waarvoor spectrums subtraction wordt toegepast omdat het spectrum hiervan in de betreffende gebieden goed te reproduceren is.

Spectrums subtraction voor twee componenten tegelijk, nl. waterdamp en kooldioxide geeft problemen, omdat de concentratie van beide componenten in het spectrum niet gelijk is.

Bij het spoelen van het monstercompartiment met stikstofgas, blijkt de concentratie van de kooldioxide het snelst af te nemen. Vijf minuten spoelen blijkt voldoende om de concentratie aan kooldioxide zodanig te verlagen dat er geen storende invloed meer van waar te nemen is.

Is spectrums subtraction voor de waterdamp nog eenvoudig toe te passen, voor een blanco HPLC als achtergrond is dat echter veel moeilijker, omdat deze achtergrond wordt veroorzaakt door een mengsel van verbindingen.

### 3. HPLC

#### 3.1 Monsters/uitgangsmateriaal/opwerking

Als modelstof zijn onderzocht de monsters injectievloeistoffen met RIKILT-nummers 21696 en 21947 (1985). In deze monsters waren met HPLC de volgende verbindingen aangetoond:

monster	component
21696	testosteronpropionaat, estradiolbenzooat en testosterondecanoaat
21947	estradiolbenzooat en een testosteronester

De opwerking van de injectiepreparaten hiervoor was als volgt: 0,25 ml injectievloeistof is met methanol verdund tot 50 ml precies. Een aliquot gedeelte overeenkomende met 10 µg van het anabolicum is over een hypersil-ODS, reversed phase kolom (lengte 15 cm, Ø 4,6 mm) gebracht.

Deze injectiepreparaten waren al eerder met HPLC-onderzocht, waarbij kwalitatieve en kwantitatieve gegevens verkregen werden. Dankzij dit vooronderzoek kon van de monsters een zodanige hoeveelheid op de kolom worden geïnjecteerd dat  $\pm$  10 µg van de relevante componenten (testosteronpropionaat in monster 21696 en estradiolbenzooat in monster



21947) in het eindextract aanwezig was. Voor testosterondecanoaat en de testosteronester is die hoeveelheid niet bekend.

### 3.2 Blanco

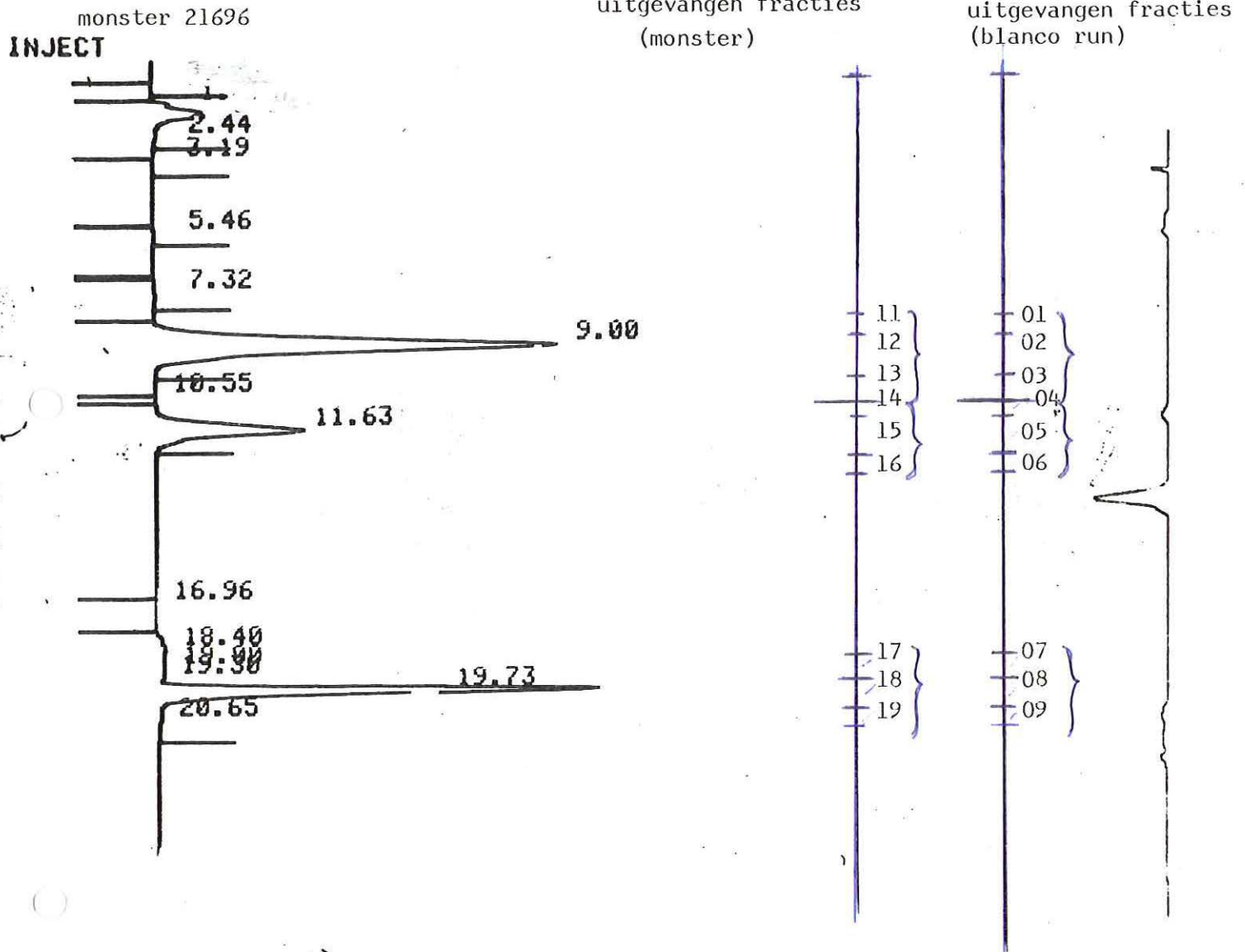
Voor deze proef zijn tevens fracties uitgevangen bij een zogeheten "blanco"-run, waarbij geen extract op de kolom is geïnjecteerd. De uitgevangen fracties corresponderen met de analytfracties van het monsterextract. In tabel 1 staan de diverse retentietijden weergegeven waartussen fracties zijn uitgevangen.

Tabel 1.

Retentietijden (min)	Fractie nr. blanco run	Fractie nr. monster run	Mogelijke aanwe- zigheid in de monster-fractie
<u>monster 21696</u>			
7.6 - 8.3	01	11(blanco vóór analyt)	TP
8.3 - 9.6	02	12(analyt)	
9.6 - 10.25	03	13(blanco ná analyt)	
10.25 - 10.95	04	14(blanco vóór analyt)	E <sub>2</sub> B
10.95 - 12.15	05	15(analyt)	
12.15 - 12.85	06	16(blanco ná analyt)	
18.65 - 19.40	07	17(blanco voor analyt)	TD
19.40 - 20.15	08	18(analyt)	
20.15 - 20.90	09	19(blanco na analyt)	
<u>monster 21947</u>			
9.9 - 11.0	21	31(blanco voor analyt)	E <sub>2</sub> B
11.0 - 12.1	22	32(analyt)	
12.1 - 13.2	23	33(blanco na analyt)	
14.3 - 15.4	24	34(blanco vóór analyt)	T-ester
15.4 - 16.5	25	35(analyt)	
16.5 - 17.6	26	36(blanco na analyt)	

Totaal zijn er dus 30 HPLC-fracties uitgevangen. In figuur 1 en 2 zijn de bijbehorende chromatogrammen weergegeven; ook is aangegeven welke fracties zijn uitgevangen.

# Chromatogram 1



----- SYSTEM CONTROLLER CONDITIONS -----

OPERATION NO. 01  
 METHOD: 04  
 PUMP SET: 04  
 COLUMN: HYP ODS

OPERATOR: HOOIJERINK  
 DETECTOR 1: 254  
 DETECTOR 2: 280

SAMPLE NAME: 21696 (.25 ML/ 50 ML) M<sup>14</sup>mg

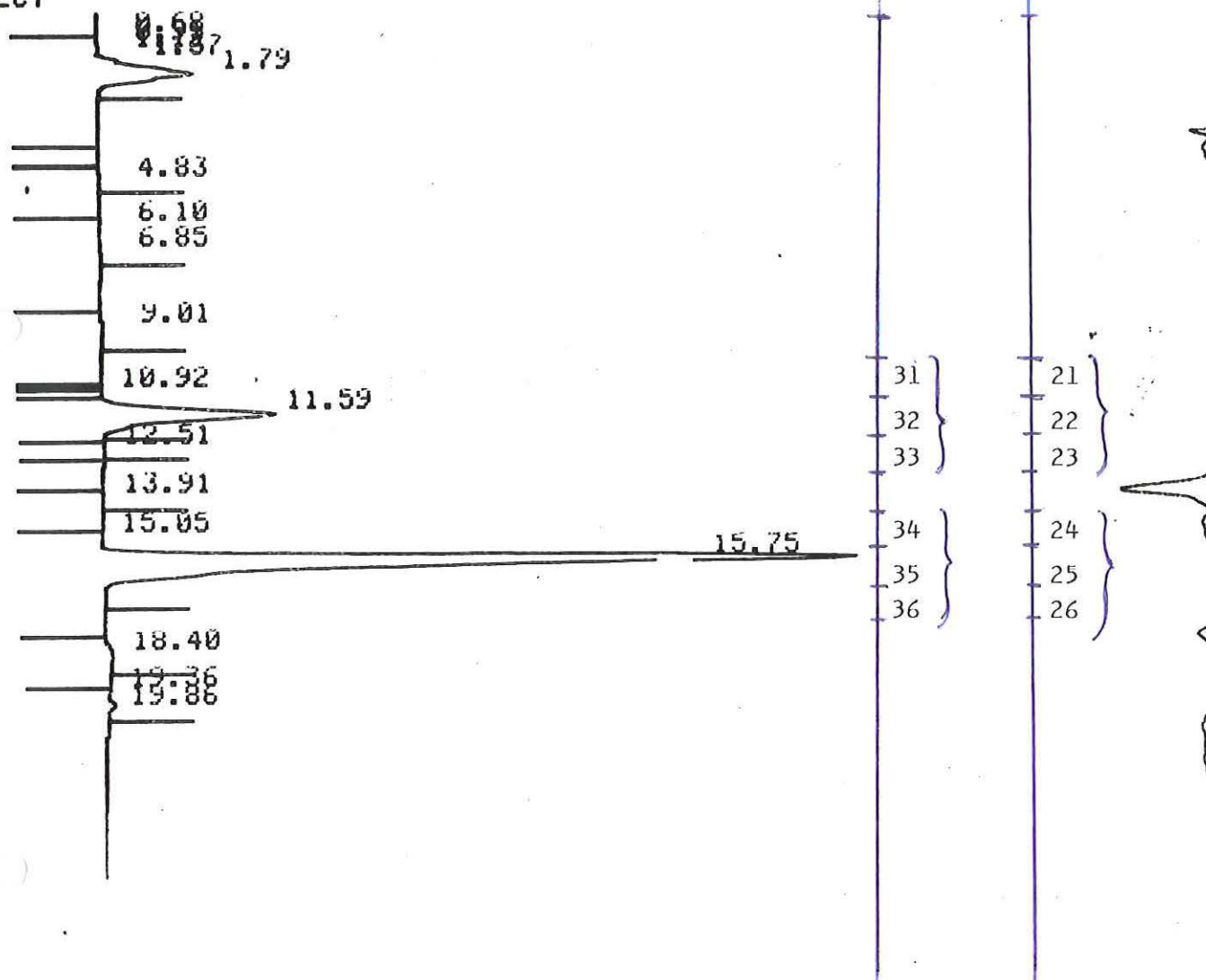
# Chromatogram 2

monster 21947

Uitgevangen  
fracties  
monsters

Uitgevangen  
fracties  
blanco-run

INJECT



## ----- SYSTEM CONTROLLER CONDITIONS -----

OPERATION NO. 02

METHOD: 04

PUMP SET: 04

COLUMN: HYP ODS

OPERATOR: HOOIJERINK

DETECTOR 1: 254

DETECTOR 2: 280

SAMPLE NAME: 21947 (.25 ML/ 50 ML) m 11 tlm 16



#### 4. Infraroodonderzoek

Opwerking van de HPLC-fracties.

Alle HPLC-fracties zijn met behulp van stikstof bij 60°C drooggedampt. Vervolgens zijn deze residuen opgewerkt volgens voorschrift opgenomen in verslag 85.120: In een goed gereinigd agaathmortiertje wordt ongeveer 5 mg KBr gebracht. Na fijnwrijven wordt hierop de indamprest, opgenomen in 100 µl methanol, gebracht. Na verwrijven en homogeniseren wordt het mengsel in het monstercupje van het DRIFT-apparaat geplaatst.

##### 4.1 Diffuse-reflectie techniek (DRIFT)

Het monstercupje werd in het DRIFT-apparaat geplaatst, waarna het monstercompartiment gedurende 5 min. met stikstof werd gespoeld. In totaal zijn 100 interferogrammen per monster opgenomen (duur  $\pm$  2 min).

Volgens de bij de FTIR techniek gebruikelijke procedure wordt uit het aldus verkregen enkelstraalspectrum en een voorhanden enkelstraal referentiespectrum een dubbelstraalspectrum berekend. Als referentie is hier in alle gevallen een spectrum van KBr poeder gebruikt. De spectra van de verschillende fracties uit tabel 1 zijn op de volgende bladzijden afgebeeld.

##### 4.2 Resultaat

Uit de verkregen spectra blijkt hoe de samenstelling van de fracties verschilt. Duidelijk is te zien dat in spectra 4,10,16,22 en 28 meer banden te zien zijn dan in de overeenkomende spectra van de blanco HPLC-spectra. Opvallend is ook dat een blanco, uitgevangen vlak voor of na een anabolicumfractie anders is dan de overeenkomende blanco's uit de "blanco-run" (vergelijk spectrum 1 met 2, 5 met 6, enz.). In de volgende infraroodspectra is het spectrum van een anabolicum te verwachten.

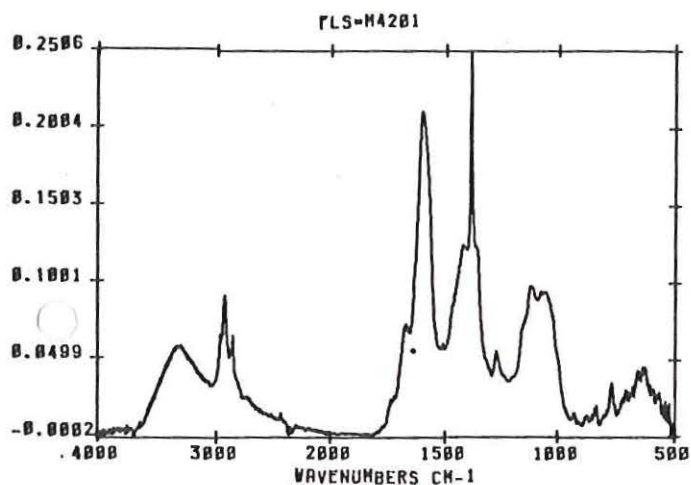
Tabel 2.

Spectrum nummer	Codering	Anabolicum	Codering overeenkomende standaard
4	M 4212	testosteronpropionaat	HOR 42028
10	M 4215	estradiolbenzooat	HOR 42009
16	M 4218	testosterondecanoaat	HOR 42070
22	M 4232	estradiolbenzooat	HOR 42009
28	M 4235	testosteron-ester	—

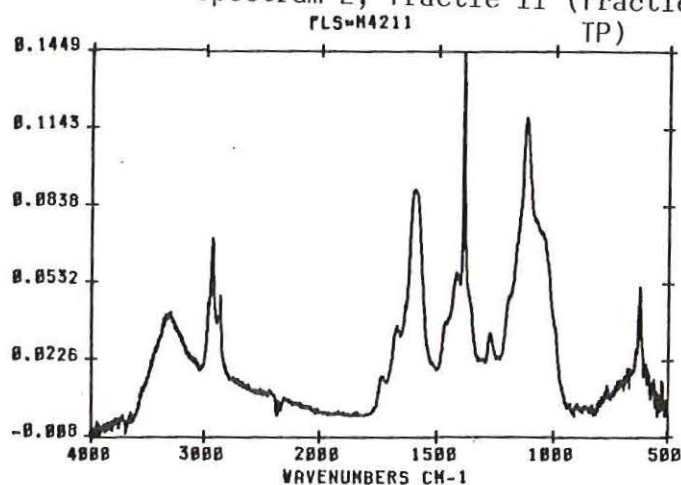
Absorptiespectra van de 1e serie  
van drie HPLC-fracties uit de  
blanco-run.

Absorptiespectra van de 1e serie  
van drie HPLC-fracties van monster  
21696.

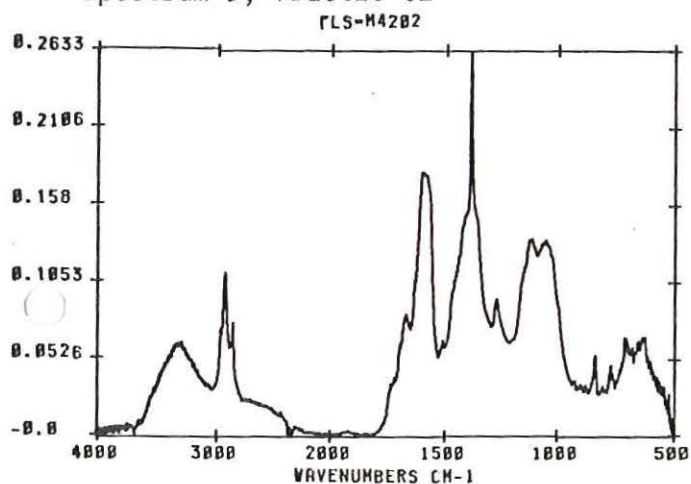
spectrum 1, fractie 01



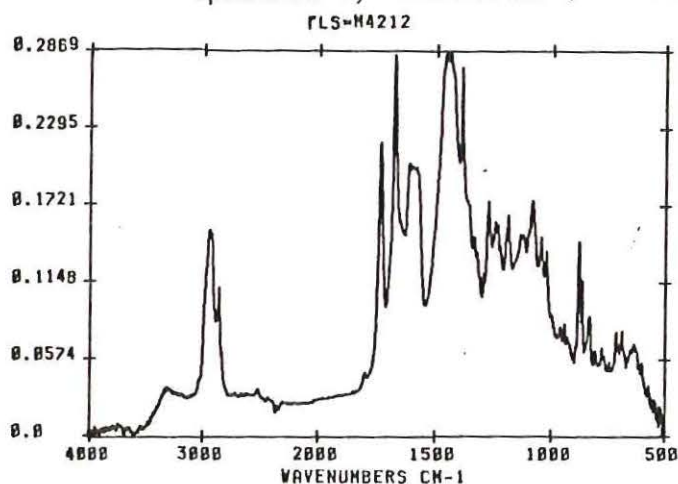
spectrum 2, fractie 11 (fractie voor TP)



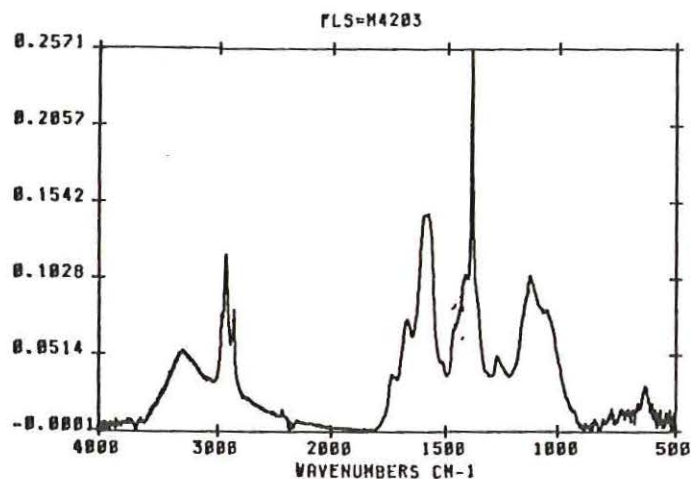
spectrum 3, fractie 02



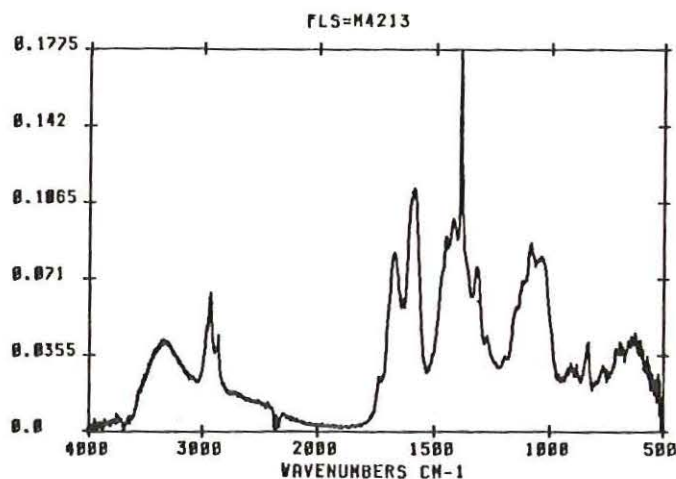
spectrum 4, fractie 12 (fractie TP)



spectrum 5, fractie 03



spectrum 6, fractie 13 (fractie na TP)

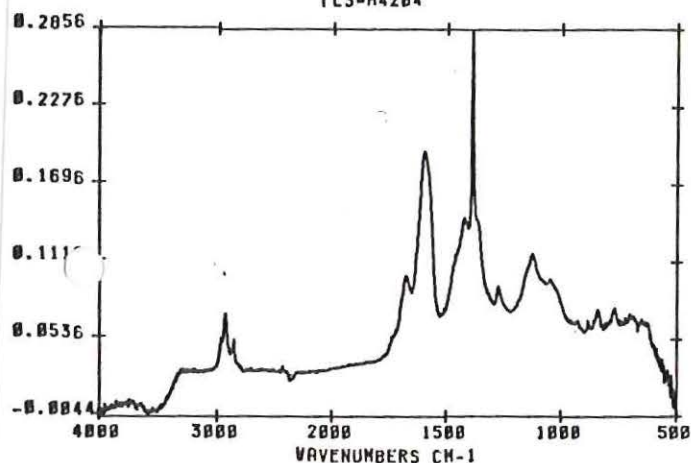


Absorptiespectra van de 2e serie  
van drie HPLC-fracties uit de  
"blanco-run".

Absorptiespectra van de 2e serie  
van drie HPLC-fracties van monster  
21696.

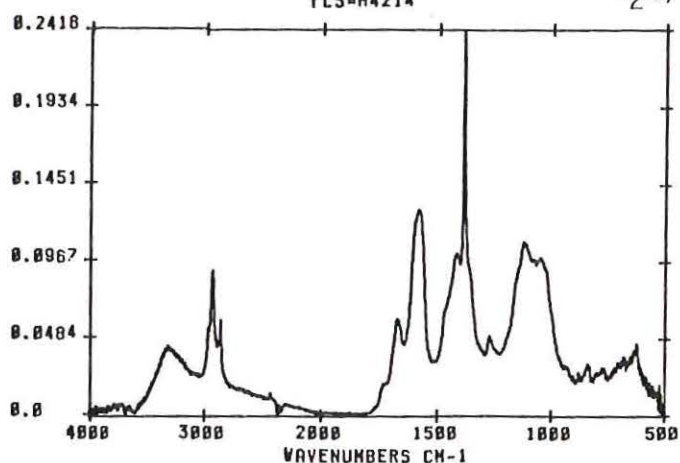
Spectrum 7, fractie 04

FLS=M4204



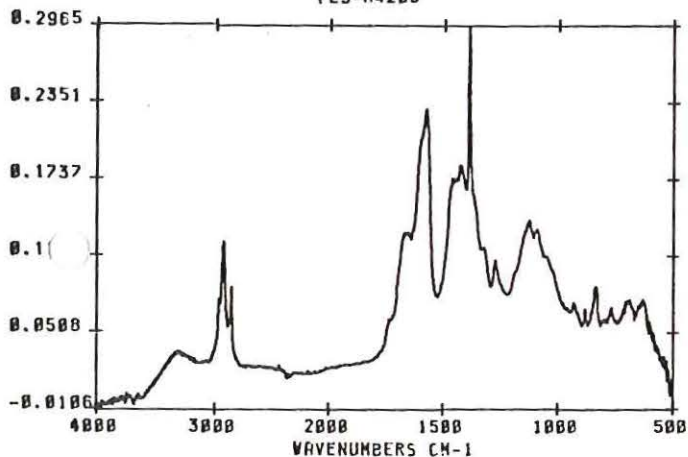
spectrum 8, fractie 14 (fractie vóór  
E<sub>2</sub>B)

FLS=M4214



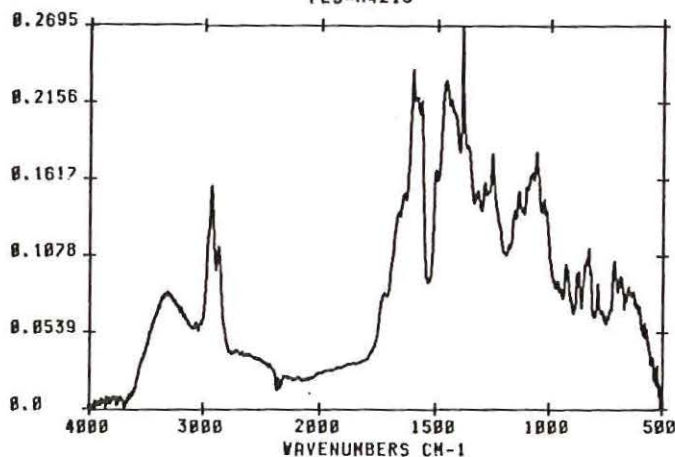
spectrum 9, fractie 05

FLS=M4205



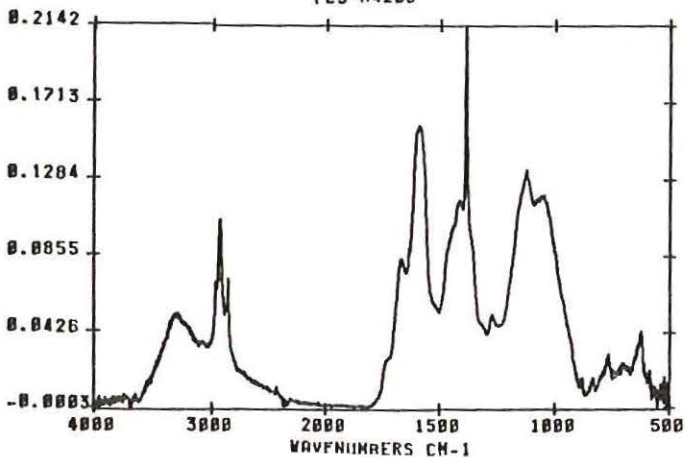
spectrum 10, fractie 15 (fractie van  
E<sub>2</sub>B)

FLS=M4215



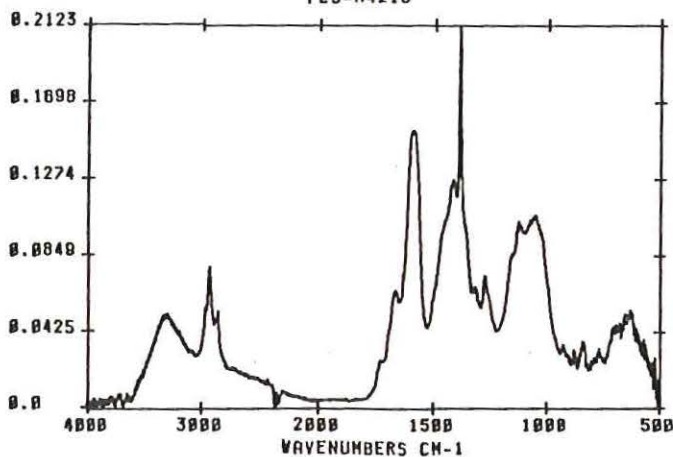
spectrum 11, fractie 06

FLS=M4206



spectrum 12, fractie 16 (fractie na E<sub>2</sub>B)

FLS=M4216

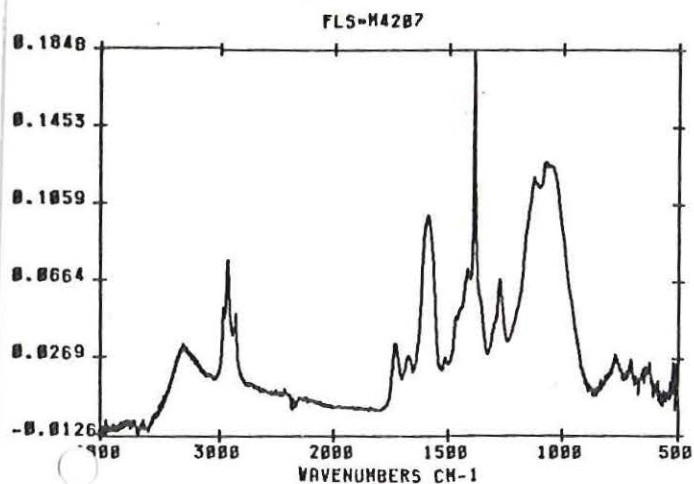




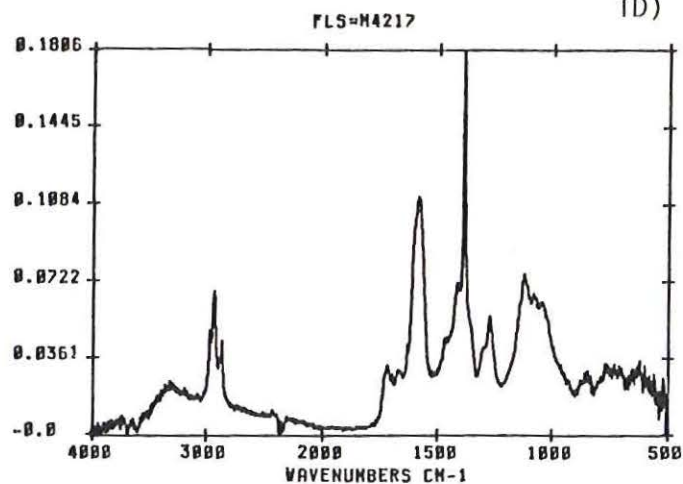
Absorptiespectra van de 3e serie  
van drie HPLC-fracties uit de  
"blanco-run".

Absorptiespectra van de 3e serie  
van drie HPLC-fracties van monster  
21696.

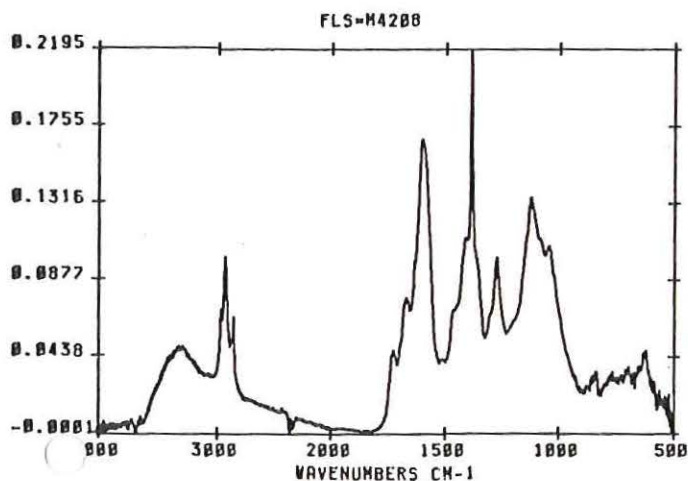
spectrum 13, fractie 07



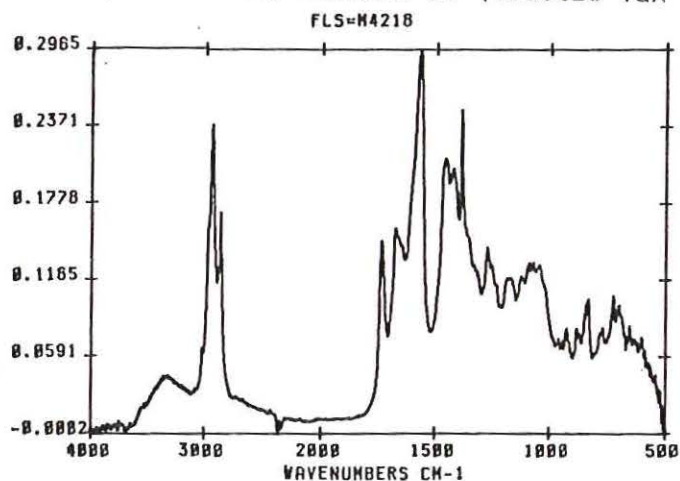
spectrum 14, fractie 17 (fractie voor  
TD)



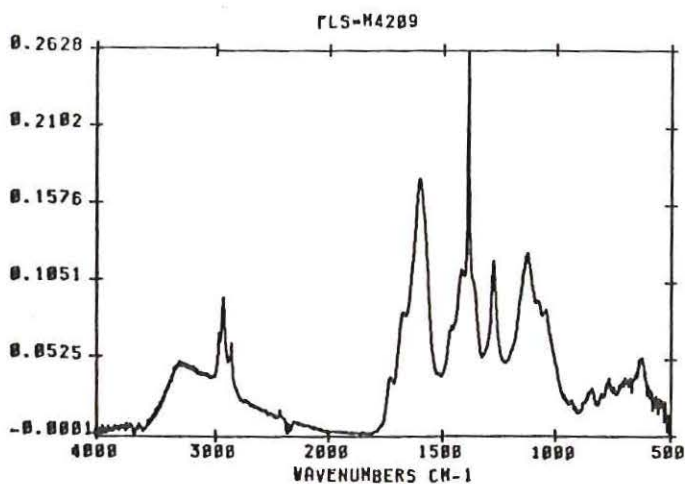
spectrum 15, fractie 08



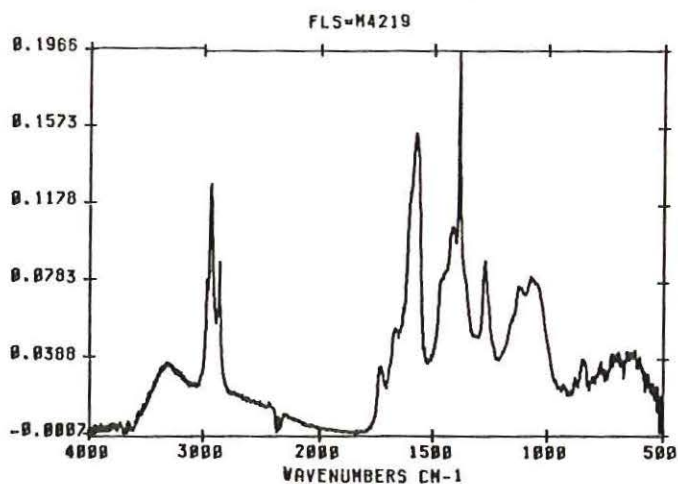
spectrum 16, fractie 18 (fractie van TD)



spectrum 17, fractie 09



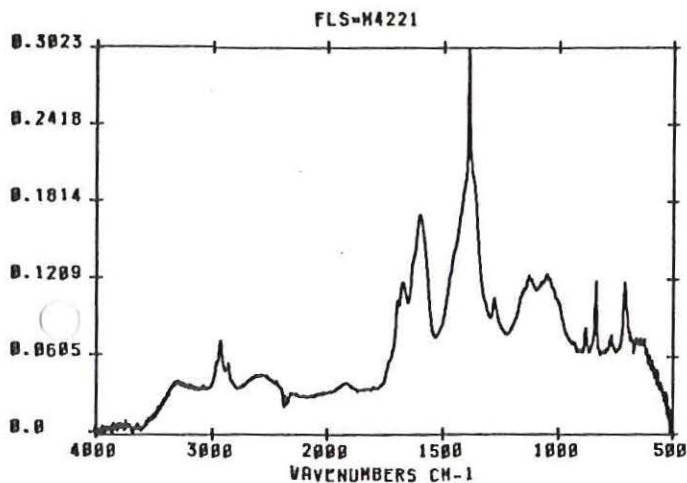
spectrum 18, fractie 19 (fractie na TD)



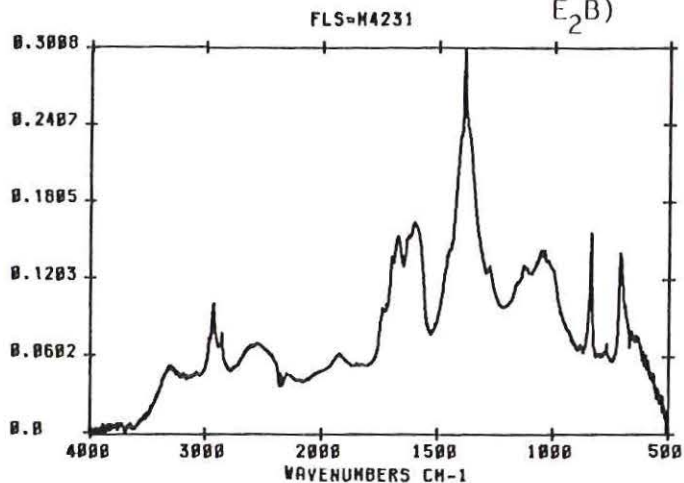
Absorptiespectra van de le serie  
van drie HPLC-fracties uit de  
"blanco-run" .

Absorptiespectra van de le serie van  
drie HPLC-fracties van monster 21947.

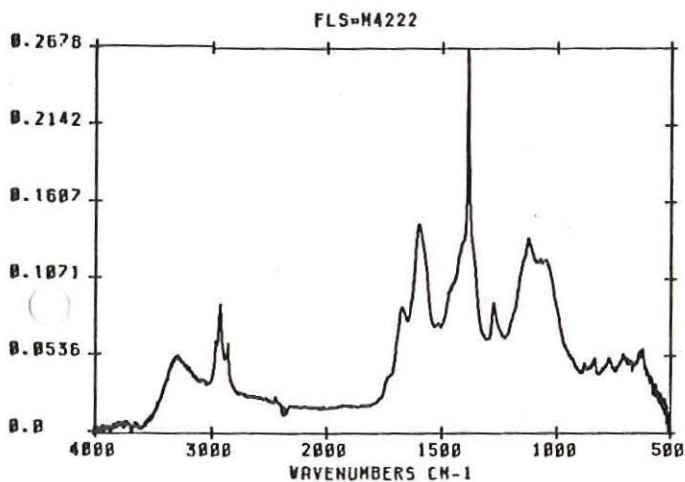
spectrum 19, fractie 21



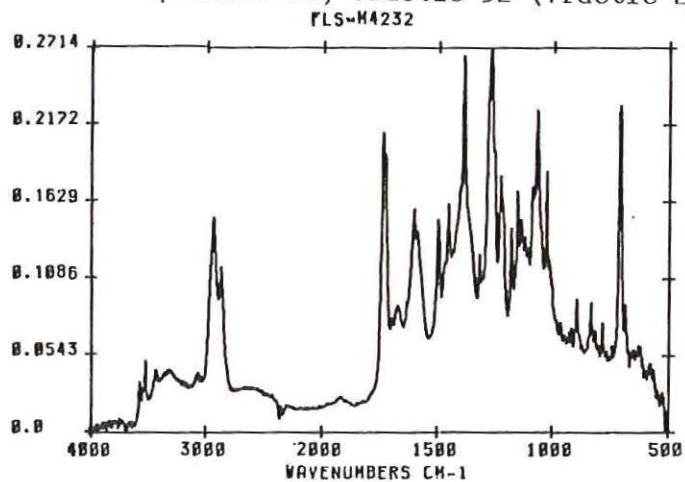
spectrum 20, fractie 31 (fractie vóór  
E<sub>2</sub>B)



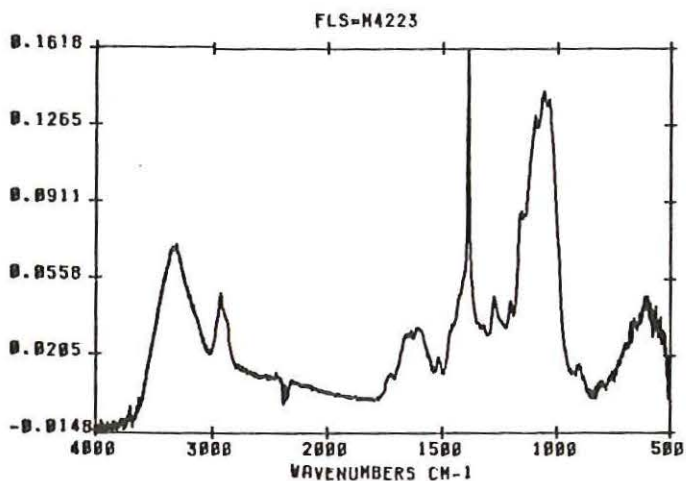
spectrum 21, fractie 21



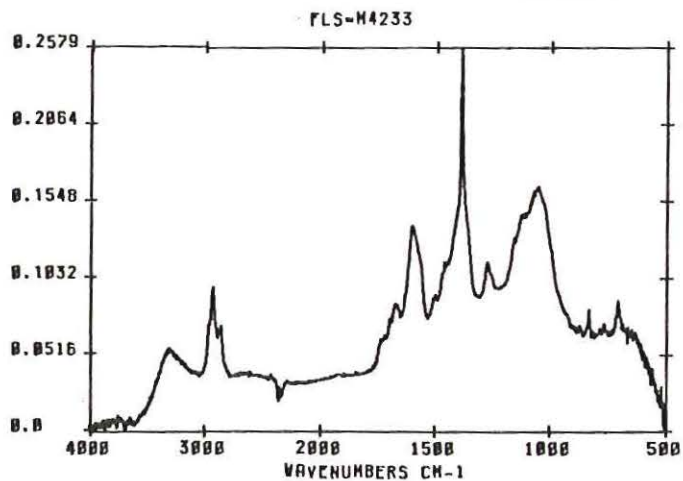
spectrum 22, fractie 32 (fractie E<sub>2</sub>B)



spectrum 23, fractie 23



spectrum 24, fractie 33 (fractie nà E<sub>2</sub>B)

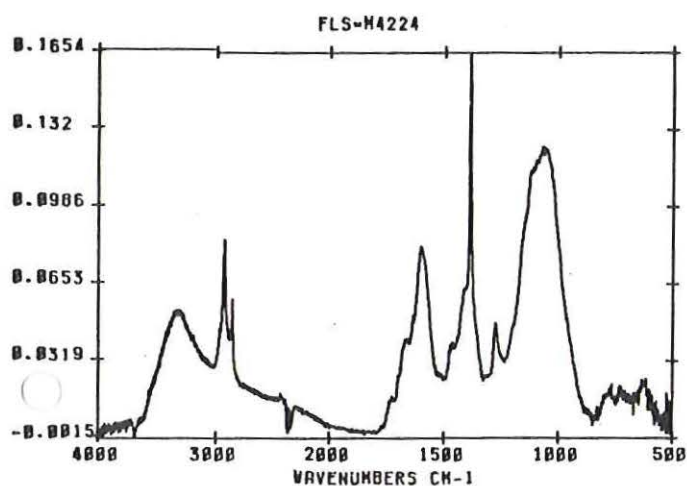




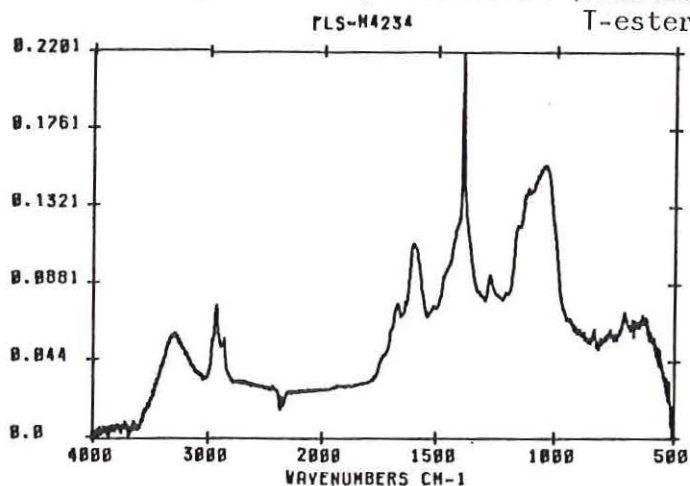
Absorptiespectra van de 2e serie van  
drie HPLC-fracties uit de "blanco-run"

Absorptiespectra van de 2e serie  
van drie HPLC-fracties van monster  
21947.

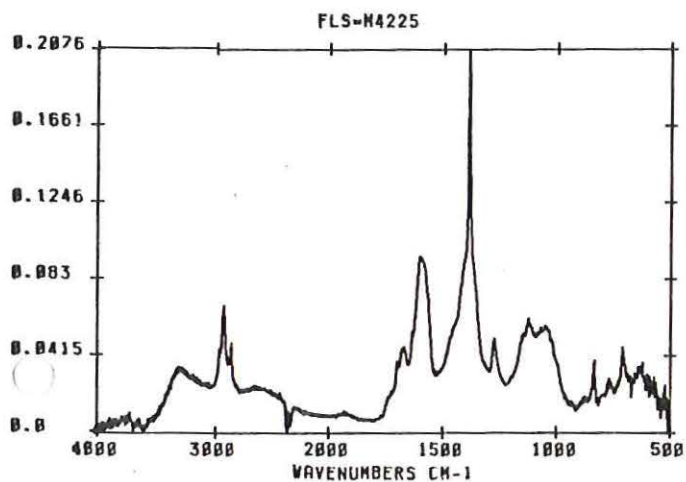
spectrum 25, fractie 24



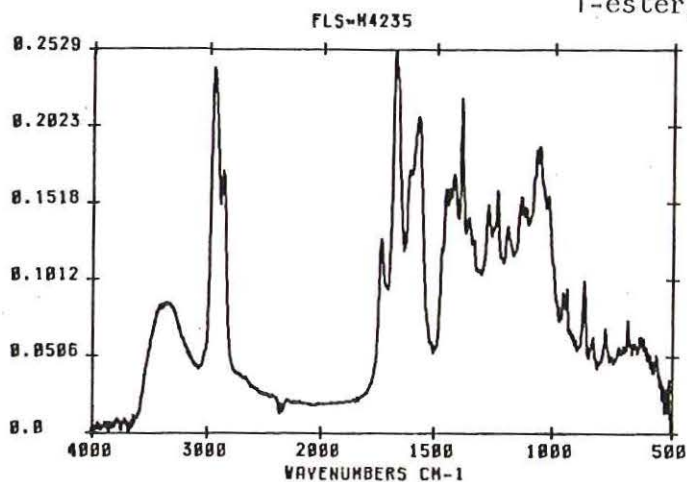
spectrum 26, fractie 34 (fractie voor  
T-ester)



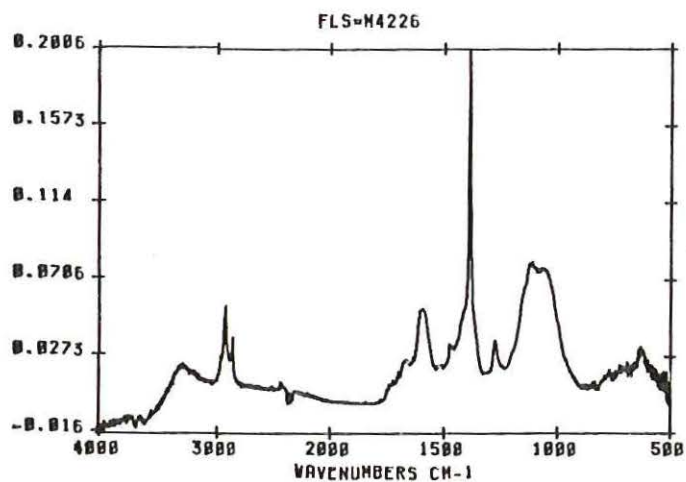
spectrum 27, fractie 25



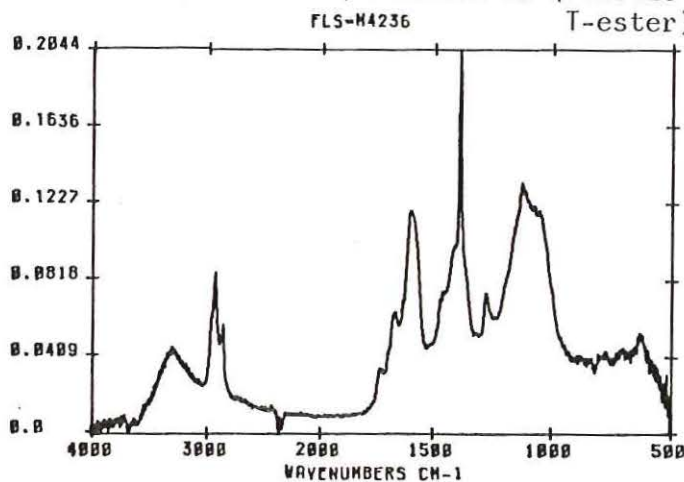
spectrum 28, fractie 35 (fractie van  
T-ester)



spectrum 29, fractie 26



spectrum 30, fractie 36 (fractie na  
T-ester)



## 5. Spectrum-subtraction

In de infraroodspectra van de blanco fracties zijn onderlinge verschillen waar te nemen, zodat spectrumsubtraction geen eenvoudige zaak zal zijn.

Gekeken is naar:

- a. Correctie voor de achtergrond, waarbij de overeenkomende fractie uit de blanco-run is genomen.
- b. Correctie voor de achtergrond, waarbij het gemiddelde van de blanco's vlak voor en vlak na een analytfractie uit de dezelfde run is genomen.

In alle gevallen is uitgegaan van reeds voor waterdamp gecorrigeerde absorptiespectra.

### 5.1 Formule spectrumsubtraction

De formule voor spectrumsubtraction is als volgt:

formule (1)

$$\text{DELTA} = \text{SPEC1} - (\text{A} \times \text{SPEC2}) + \text{Y}$$

hierin is:

Delta de nieuwe file, na spectrumsubtraction.

SPEC1 het spectrum dat gecorrigeerd wordt.

SPEC2 het overeenkomstig blankospectrum.

A de factor waarmee de computer het referentiespectrum automatisch heeft vermenigvuldigd. Deze factor is manueel te beïnvloeden. De automatisch gekozen factor wordt o.a. beïnvloed door het ingestelde gebied (wordt een ander gebied, of een kleiner gebied genomen, dan kan een andere factor verwacht worden).

Voor dit onderzoek is de correctiefactor niet manueel beïnvloed, omdat de achtergrond uit een mengsel van verbindingen bestaat.

Y de waarde die het absorptiespectrum heeft op het laagste punt op de Y-as. Ook deze factor wordt door de computer berekend. Mocht dit punt onder de 0-lijn liggen dan moet met behulp van ROLL in subtraction-mode het spectrum boven deze lijn worden gebracht.

### 5.2 Correctie van het spectrum met overeenkomstige fractie uit de blanco.

De absorptiespectra zijn met de volgende blanco's gecorrigeerd.

Tabel 3.

Monsterspectrum is spectrum van fractie	Blanco spectrum is spectrum van fractie	Correctie factor	Nieuw spectrum
12	02	1,2323	31
15	05	1,0962	33
18	08	1,2109	34
32	22	1,0605	35
35	25	1,7049	37

### 5.3 Correctie voor het spectrum samengesteld uit de spectra in dezelfde run van de fracties vlak vóór en vlak na de analytfractie

De spectra van fractie 12 en 32 zijn gecorrigeerd voor de gemiddelde achtergrond verkregen van de fracties vlak voor en na de analytfractie, omdat in deze spectra de spectra van de anabolica te herkennen zijn. In onderstaande tabel wordt aangegeven voor welke spectra het analyt-spectrum gecorrigeerd is.

Tabel 4.

Monsterspectrum is spectrum van fractie	Blanco spectrum vlak vóór analyt-fractie	Blanco spectrum vlak na analyt-fractie	Nieuw Spectrum
12	11	13	32
32	31	33	36

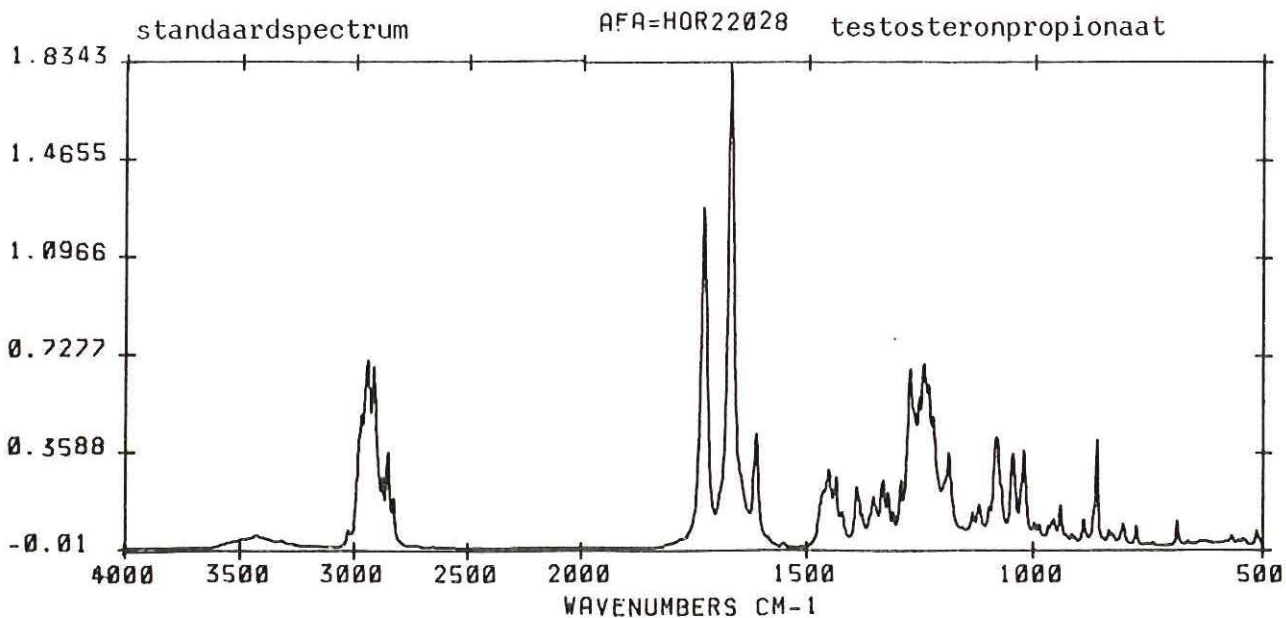
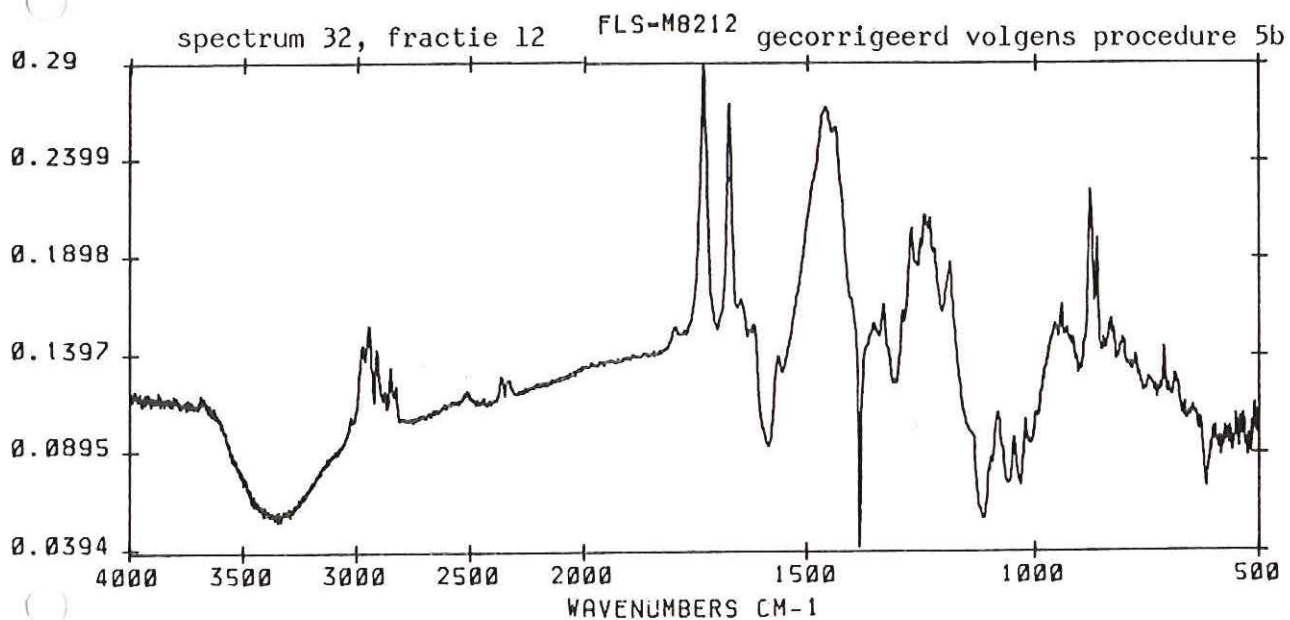
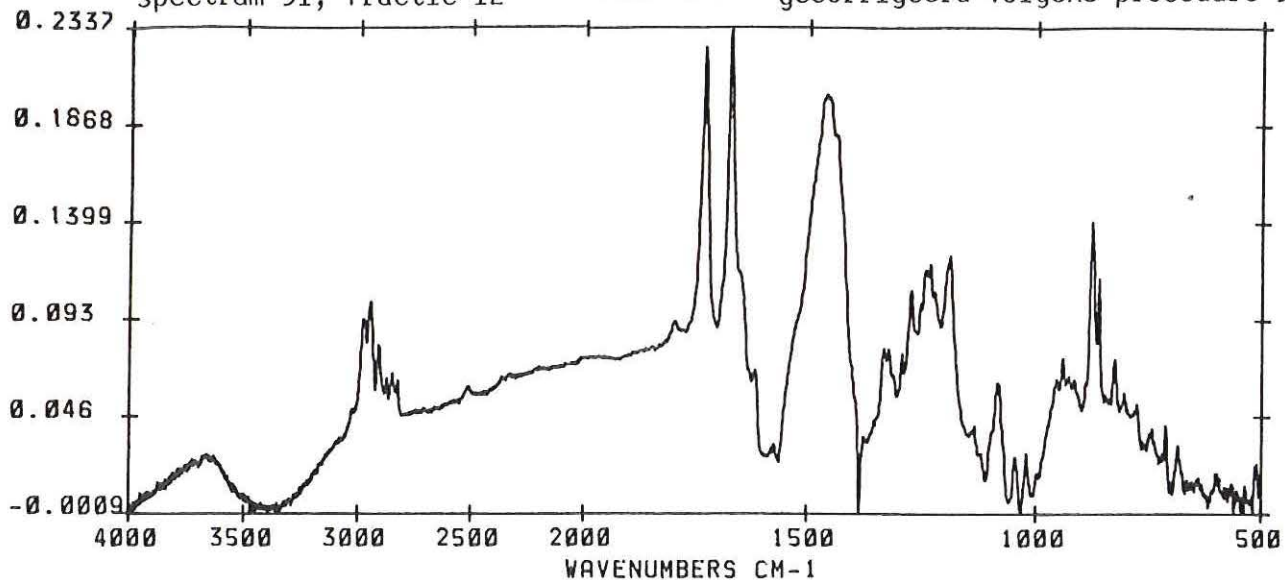
### 5.4 Resultaat

In de spectra verkregen van fractie 12 (spectra 31 en 32) is testosteronpropionaat te herkennen. Er zijn geen noemenswaardige verschillen waar te nemen tussen spectra 31 en 32.

In het spectrum, verkregen van fractie 15 (spectrum 33) is estradiolbenzoaat niet te herkennen.

In het spectrum, verkregen van fractie 18 (spectrum 34) is testosteron-decanoaat niet te herkennen.

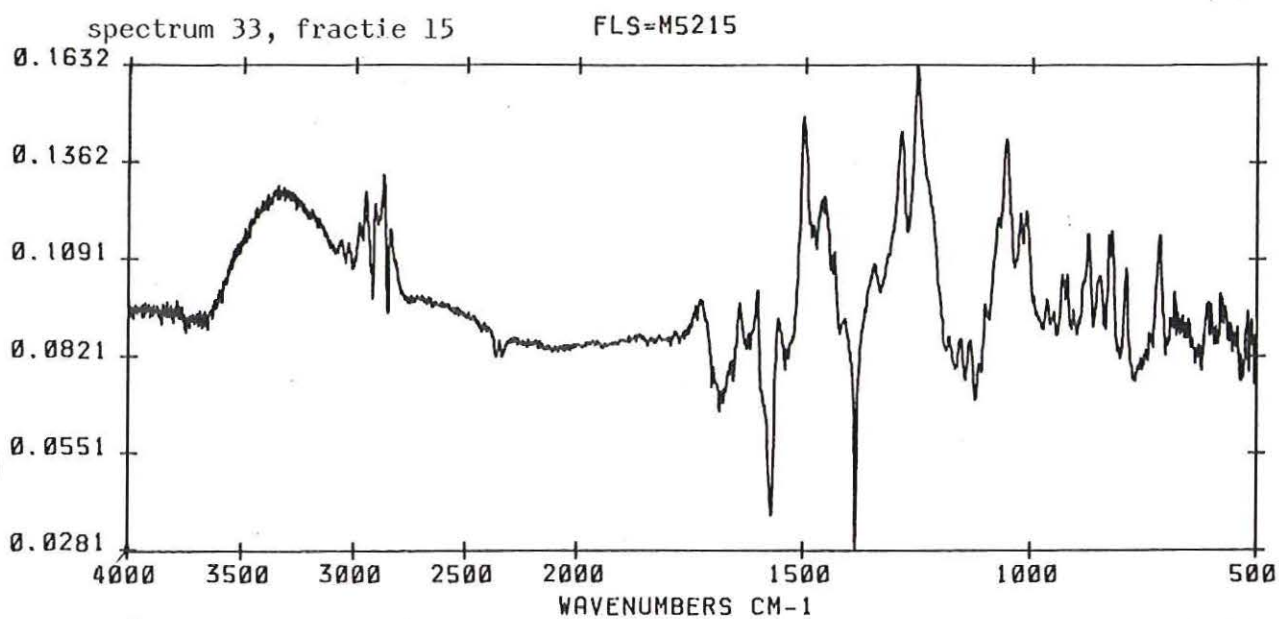
Absorptie-spectra van fractie 12, die gecorrigeerd zijn voor de achtergrond. In deze fractie werd met behulp van HPLC-HPTLC testosteronpropionaat aangetoond.  
 spectrum 31, fractie 12 FLS-M5212 gecorrigeerd volgens procedure 5a



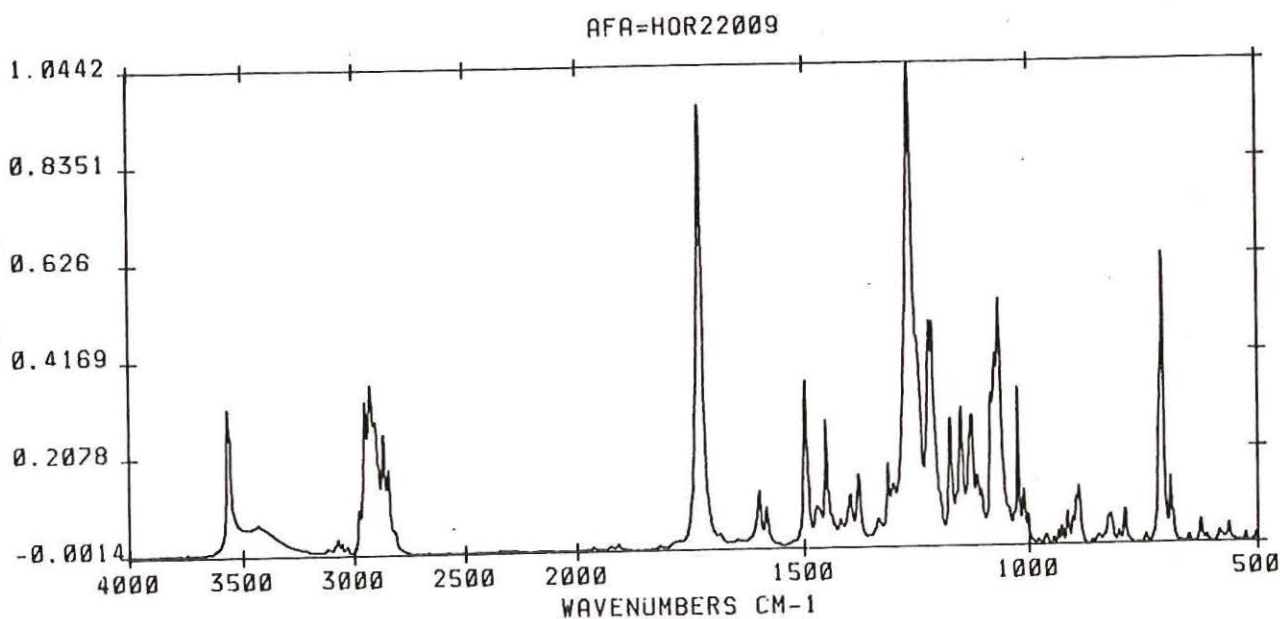


Absorptiespectrum van fractie 15, die gecorrigeerd is voor de achtergrond.  
In deze fractie werd met behulp van HPLC-HPTLC estradiolbenzoaat aangetoond.

Gecorrigeerd volgens procedure 5a.

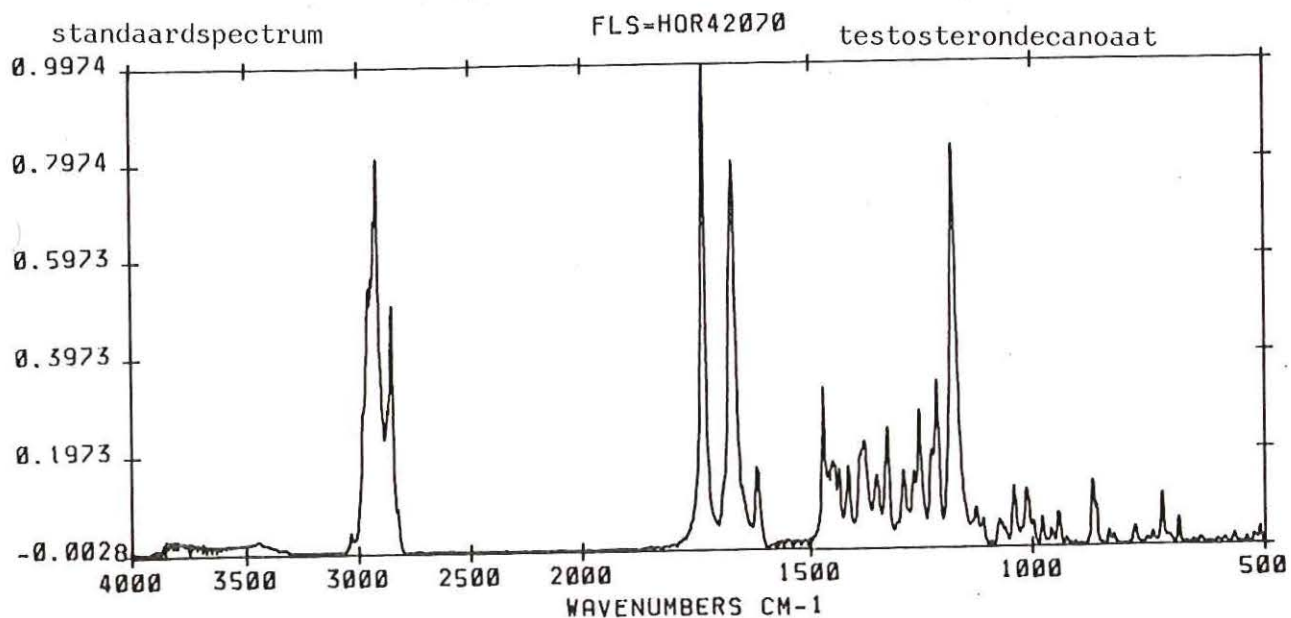
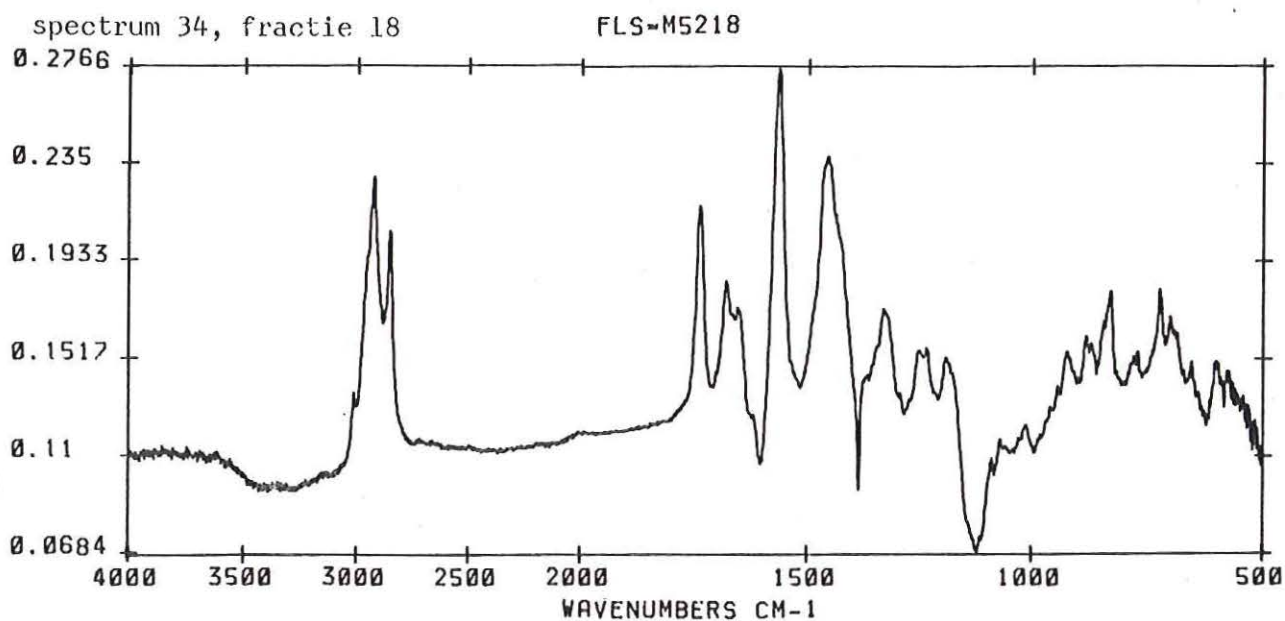


absorptiespectrum van estradiolbenzoaat





Absorptiespectrum van fractie 18, die gecorrigeerd is voor de achtergrond.  
In deze fractie is met behulp van HPLC-HPTLC testosterondecanoaat aangetoond.  
Gecorrigeerd volgens procedure 5a.



In de spectra verkregen van fractie 32 (fractie 35 en 36) is estradiolbenzooat te herkennen. Er zijn geen noemenswaardige verschillen waar te nemen tussen spectra 35 en 36.

#### 5.5 Matrix c.q. achtergrond

Bij nader onderzoek van de blanco-HPLC bleek dat een groot deel van het spectrum afkomstig is van de verbindingen uit het eluens.

Uit de gebruikte methanol (lichrosolv-Merck 6007) komen nog onbekende verbindingen mee over de kolom. Dit is aangetoond met spectrum 38. Om het werk met een HPLC-voorzuiivering voor infraroodonderzoek te kunnen voortzetten is een betere kwaliteit methanol gewenst.

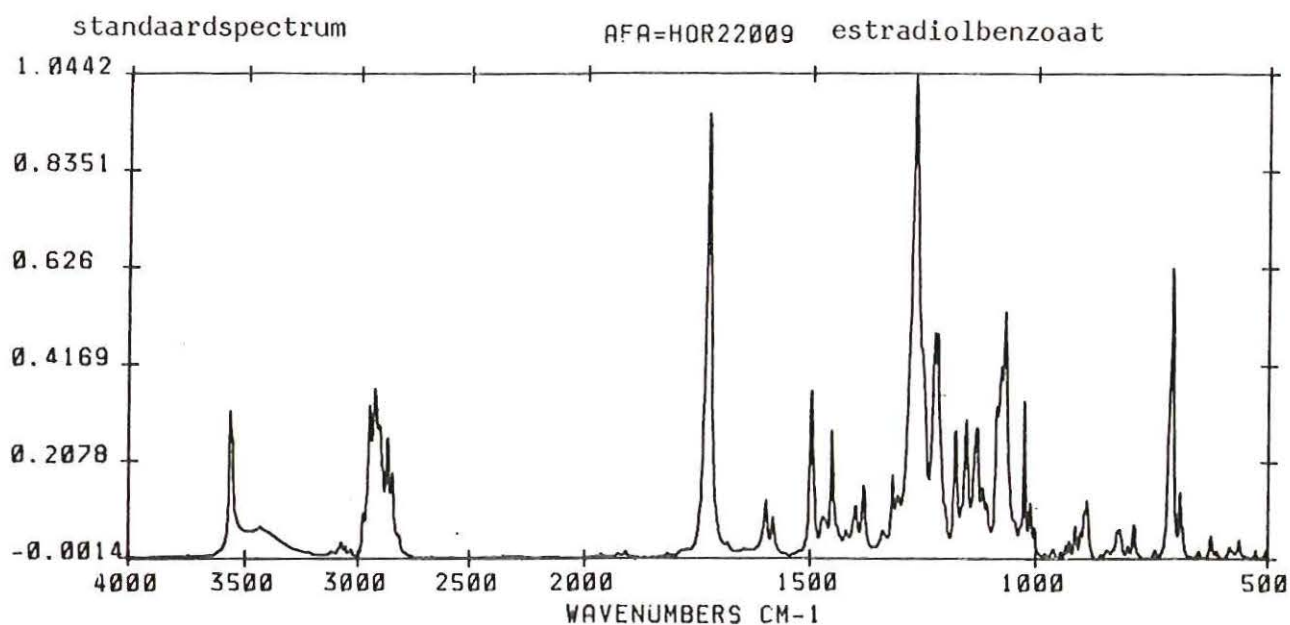
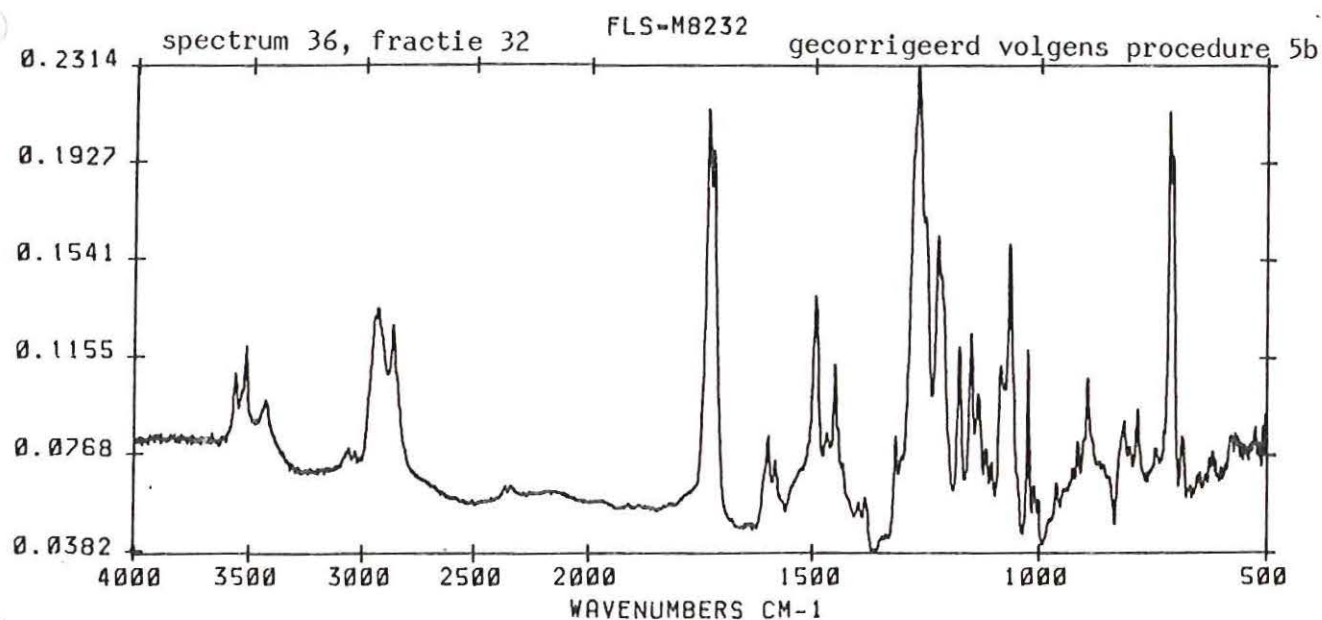
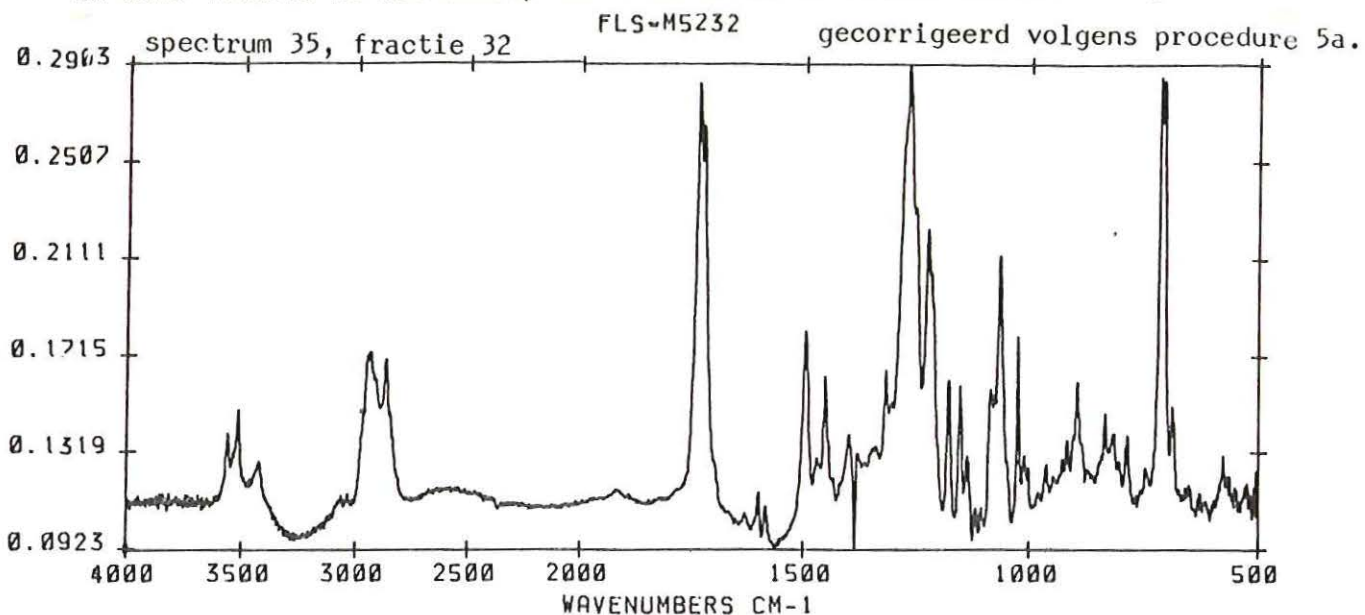
#### 6. Conclusie

Voor de in dit onderzoek beschouwde monsters injectievloeistoffen blijkt dat correctie voor de achtergrond van spectra, verkregen van HPLC-fracties het niet uitmaakt of deze correctie uitgevoerd wordt met:

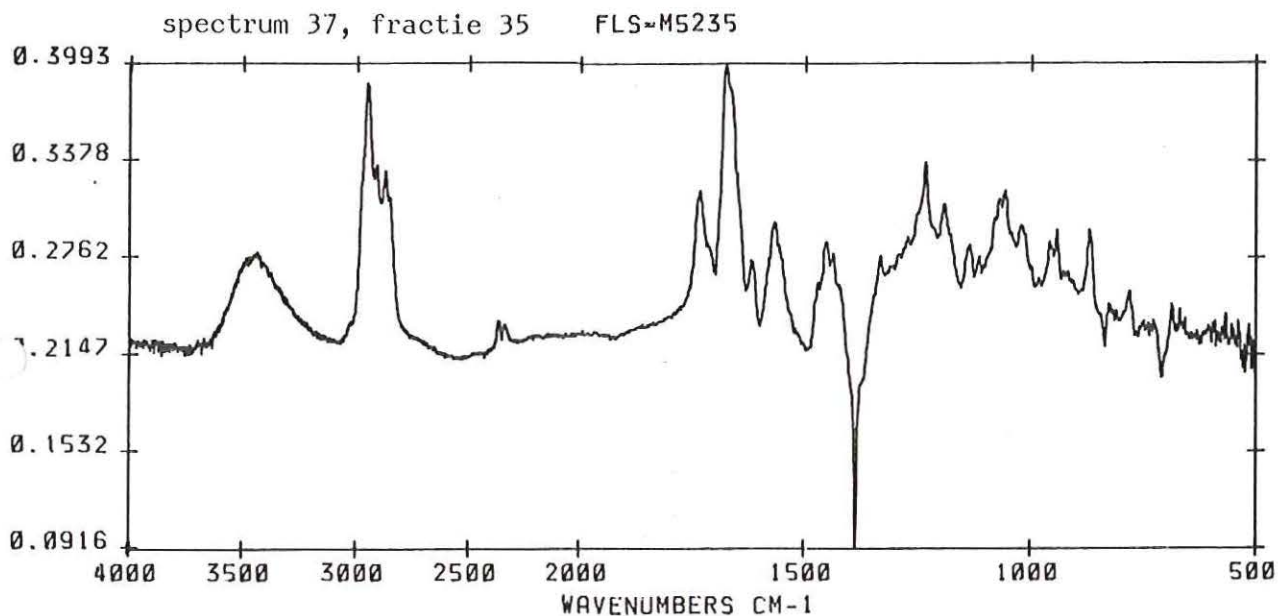
- a. De blanco HPLC uit een apart uitgevoerde blanco-run met dezelfde retentie als de analytfractie of
- b. De blanco, gevormd uit een gemiddelde blanco, vlak voor en vlak na de analytfractie.

Methode b. is eenvoudiger uit te voeren en verdient daarom de voorkeur.

Absorptiespectra van fractie 32, die gecorrigeerd zijn voor de achtergrond.  
In deze fractie is met behulp van HPLC-HPTLC estradiol-benzoaat aangetoond.



Absorptiespectrum van fractie 35 die gecorrigeerd is voor de achtergrond. In deze fractie is met behulp van HPLC-HPTLC een testosteron ester aangetoond. Gecorrigeerd volgens procedure 5a.



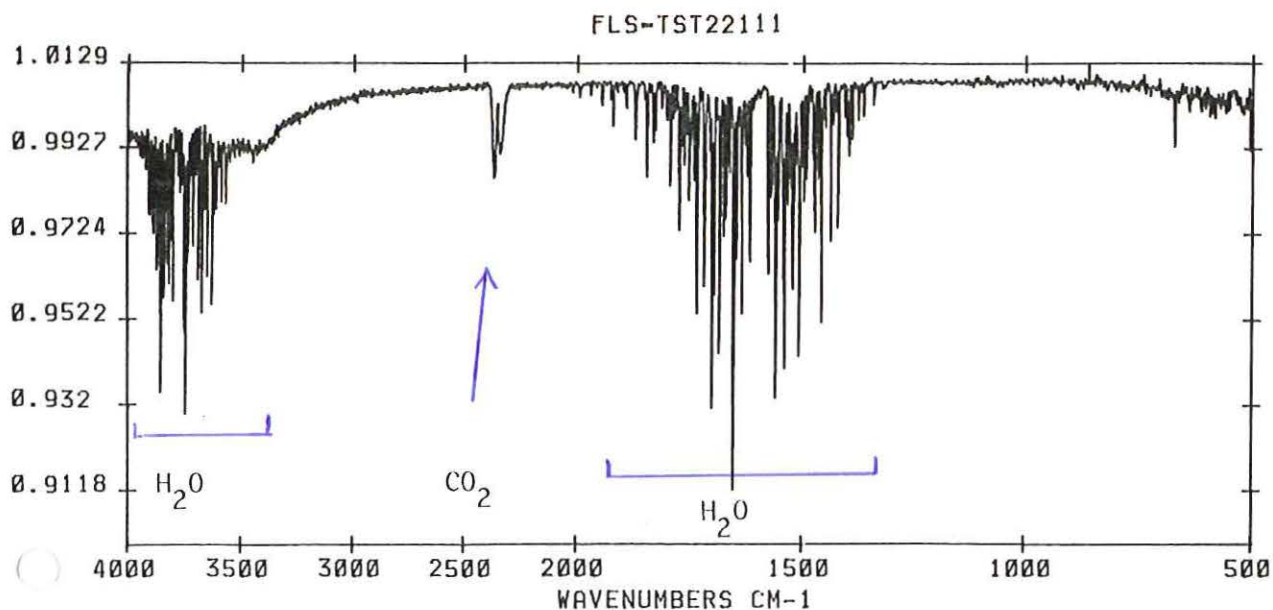
Van de voorhanden zijnde infrarood spectra was geen spectrum dat op spectrum 37 leek.

### Spectrum A

Transmissiespectrum van waterdamp met kooldioxide.

Waterdamp is aanwezig tussen 4000 en 3500  $\text{cm}^{-1}$  en 1900 en 1300  $\text{cm}^{-1}$ .

Kooldioxide is aanwezig tussen 2300 en 2400  $\text{cm}^{-1}$ .



### Spectrum 38

Absorptiespectrum van de indamprest van methanol (kwaliteit Merck-Lichrosolv).

Duidelijk zijn banden te herkennen die ook voorkomen in de diverse spectra, afkomstig van de HPLC-fracties.

